

特開平9-21778

(43) 公開日 平成9年(1997)1月21日

| (51)Int.Cl. ⁸ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 | |
|--------------------------|--------|--------|---------|--------|---------|
| G 0 1 N | 27/327 | | G 0 1 N | 27/30 | 3 5 3 R |
| | 27/28 | 3 3 1 | | 27/28 | 3 3 1 Z |
| | | | | 27/30 | 3 5 3 Z |

審査請求 未請求 請求項の数 4 F D (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平7-194114

(22) 出願日 平成7年(1995)7月7日

(71) 出願人 000001443

カシオ計算機株式会社

東京都新宿区西新宿2丁目6番1号

(71) 出願人

591010619

軽部 征夫

神奈川県川崎市宮前区東有馬1-3-16

(72) 発明者

当山 忠久

東京都八王子市石川町2951番地の5 カシ

オ計算機株式会社八王子研究所内

(72) 発明者

軽部 征夫

神奈川県川崎市宮前区東有馬1-13-16

(74) 代理人

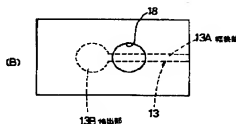
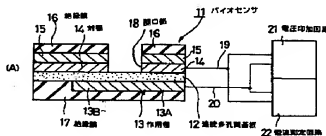
弁理士 杉村 次郎

(54) 【発明の名称】 バイオセンサ

(57) 【要約】

【課題】 被検査液が微量でも迅速に基質濃度の測定ができ、且つ小型化を図ることができるようにする。

【解決手段】 酵素が固定化された連続多孔質基板12の一方の表面に作用極13を設け、他方の表面に対極14を設けると共に、対極14側に開口部18を形成する。また、対極14の外側表面には基板15と絶縁膜16とが順次形成されている。作用極13と連続多孔質基板12の一方の表面側には全面に絶縁膜17が形成されている。開口部18から導入された被検査液は、速やかに連続多孔質基板12介して作用極13と対極14との間に浸透して基質濃度の測定が可能となる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 相対向する一対の電極のうち一方の電極の対向内側面に、酵素あるいは酵素とメディエータとが固定化された連続多孔質層が設けられ、他方の電極側に前記酵素と反応を生じる被検査液が前記連続多孔質層に導通する開口部を形成したことを特徴とするバイオセンサ。

【請求項2】 前記他方の電極と前記連続多孔質層との間に、前記開口部と連通して被検査液が導入される間隙が形成されていることを特徴とする請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項3】 前記一対の電極の対向外側面に絶縁層が設けられ、前記開口部は、前記絶縁層を貫通してなることを特徴とする請求項1または請求項2記載のバイオセンサ。

【請求項4】 前記一対の電極と前記連続多孔質層とが可撓性を有し、前記絶縁層が可撓性および柔軟性を有することを特徴とする請求項1～請求項3のいずれかに記載のバイオセンサ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、バイオセンサに関し、さらに詳しくは、各種液体の成分濃度を、固定化した酵素などを利用して測定する、臨床検査や水質検査などに用いられる酵素センサに係る。

【0002】

【従来の技術】従来、固定化した酵素を用いたバイオセンサとしては、図4に示すものが知られている。このバイオセンサは、絶縁基板1の一面表面に作用極2が設けられ、その他側面に対極3が設けられている。そして、作用極2の表面には、固定化酵素膜4が被着されている。このような構成のバイオセンサは、被検査液の中にセンサ自体を浸して両電極間に被検査液が存在するようにして検査を行っている。このバイオセンサにおいては、グルコース酸化酵素の触媒作用により、グルコースが酸化されるときに消費される酵素の減少、またはこのとき生成される過酸化水素の増大を電流測定することにより、グルコース濃度を測定することができるようにしている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記した従来のバイオセンサにおいては、絶縁基板1により作用極2と対極3とが隔てられているため、バイオセンサを被検査液に浸けて両電極間に被検査液を満たすようにしなければならず、このためには相当量の被検査液が必要となる。このように、従来のバイオセンサでは、被検査液の微量測定ができないという問題点があった。この発明の課題は、小型化が図れと共に、被検査液が微量でも迅速に基質濃度の測定ができるようにすることである。

【0004】

【課題を解決するための手段】請求項1記載の発明は、相対向する一対の電極のうち一方の電極の対向内側面に、酵素あるいは酵素とメディエータとが固定化された連続多孔質層が設けられ、他方の電極側に前記酵素と反応を生じる被検査液が前記連続多孔質層に導通する開口部を形成したことを、特徴としている。請求項2記載の発明は、前記他方の電極と前記連続多孔質層との間に、前記開口部と連通して被検査液が導入される間隙が形成されていることを特徴としている。請求項3記載の発明は、前記一対の電極の対向外側面に絶縁層が設けられ、前記開口部は、前記絶縁層を貫通してなることを特徴としている。請求項4記載の発明は、前記一対の電極と前記連続多孔質層とが可撓性を有し、前記絶縁層が可撓性および柔軟性を有することを特徴としている。

【0005】請求項1記載の発明においては、他方の電極側に形成された開口部から被検査液を導通することができ、開口部から導通された被検査液は、連続多孔質層内の連続孔に染み込む。この連続多孔質層には、酵素が固定化されているため、被検査液は確実に酵素の触媒作用を受けて酵素反応を起こす。また、開口部から導入された被検査液は、相対向する一対の電極間の多孔質層を除く空隙を満たす量の被検査液があれば電極間に基質濃度に応じて電流を流すことが可能となる。なお、連続孔の径寸法を調節することにより、妨害物質となる例えばタンパク質などの高分子が一方の電極（作用極）に到達するのを防止することが可能となる。請求項2記載の発明においては、他方の電極と連続多孔質層との間に、開口部と連通して被検査液が導入される間隙が形成されているため、電極間に被検査液を速やかに介在させることができる。請求項3記載の発明においては、一対の電極の対向外側面に絶縁層が設けられているため、外部から電極に対して電氣的影響が及ぶのを防止することができる。また、開口部は、絶縁層を介しているため、絶縁層の外側から被検査液が容易に多孔質層まで導通できる。請求項4記載の発明においては、絶縁層が可撓性および柔軟性を有し、かつ一対の電極と連続多孔質層とが可撓性を有するため、例えばまぶたの下にセンサを挿入する場合や口のなかにセンサを挿入する場合などに、人体が損傷を受けるのを防止する作用がある。

【0006】

【発明の実施の形態】以下、この発明に係るバイオセンサの詳細を図面に示す実施形態に基づいて説明する。

（実施形態1）図1（A）および（B）は、この発明の実施形態1を示している。図1（A）に示すように、図中11はバイオセンサであり、このバイオセンサ11においては、例えばグルコースの酸化酵素であるグルコースオキシダーゼを固定化した連続多孔質基板12の、一方の表面に作用極13が設けられ、他方の表面に対極14が設けられている。なお、この連続多孔質基板12

3

は、例えばポリテトラフルオロエチレンなどのフッ素樹脂を連続多孔質構造にしたもので形成されている。また、この連続多孔質基板12内の表面にグルコースオキシダーゼを固定化するには、グルコースオキシダーゼを有機質膜に例えば架橋法や包埋法などの周知の方法で固定化することができる。この場合、有機質膜が連続多孔質基板12の連続孔を開塞させないために、例えば、連続多孔質基板12にエアーを供給しながら、グルコースオキシダーゼを含む有機質膜を連続孔内面に付着させるなどの方法を用いることができる。

【0007】そして、対極14の外側には絶縁性を有する基板15、絶縁膜16が順次形成されている。また、作用極13の外側にも、作用極13および連続多孔質基板12を覆う絶縁膜17が形成されている。なお、上記した基板15、絶縁膜16は、被検査液に対してぬれ性のよい材料で構成することが望ましい。そして、作用極13の形状は、図1(B)の平面図に示すように、細長い幅状部13Aと、所定の面積を有する、円形状の検出部13Bとから構成されている。また、対極14は、後記する開口部18を除いて、連続多孔質基板12の他方の表面全体にわたって形成されている。そして、この対極14と、基板15と、絶縁膜16には、連続多孔質基板12を露出させる、被検査液を導入するための開口部18が貫通して形成されている。なお、この開口部18が形成された位置は、連続多孔質基板12の一方の表面に設けられた作用極13の検出部13Bに対して、平面的に見て隣接する位置に設定されている。そして、作用極13の幅状部13Aの端縁部と、対極14とは、配線19、20を介して電圧印加回路21および電流測定回路22が接続されている。

【0008】本実施形態では、作用極13の幅状部13Aと対極14との対向する面積が小さいため、実質的に検出部13Bと対極14との間に介在された被検査液中の基質濃度が測定されことになる。このように被検査液の基質濃度を測定する場合、検出部13Bと対極14との間には、平面的に見て検出部13Bに隣接する位置にある開口部18から被検査液が導入されるため、きわめて迅速に電極間に被検査液が微量でも十分到達する。また、本実施形態のバイオセンサでは、電極どうしが対向した立体的な構造で、しかも電極間の距離を極めて短くすることができるため、装置の小型化を図ることができる。ところで、連続多孔質基板12の連続孔内では、被検査液が毛細管現象により保持されるため、電極間に被検査液を確実に介在させることができる。このため、電極間に被検査液が介在された状態で、被検査液中のグルコース濃度の測定が可能となる。さらに、本実施形態では、酵素を連続多孔質基板12の連続孔内の表面に固定化されているため、酵素と被検査液との接触面積が実質的に大きくなり酵素反応が効率的に行われ、測定効率を向上させることができる。また、連続多孔質基板12

4

の連続孔の径寸法を例えばタンパク質などの高分子が通過できないような径寸法に設定しておけば、基質濃度の測定に際して妨害物質となる高分子が作用極13に到達するのを防ぎ、固定化した酵素により発生した例えば過酸化水素を効率よく測定することが可能となる。

【0009】本実施形態のバイオセンサ11を用いて、グルコースを含む、例えば血液、尿、だ液、涙液、などの被検査液中のグルコースの濃度測定を行うには、まず、微量の被検査液を開口部18に滴下する。そして、被検査液が連続多孔質基板12の連続孔内に浸透すると、被検査液中のグルコースが、連続孔内に固定化されているグルコースオキシダーゼによって酸化され、一方グルコースオキシダーゼ自体は還元されて還元型となる。このとき、被検査液もしくは、被検査液とともに存在する液体などの中に酵素が存在していれば、酵素が電子受容体となり、還元型となっているグルコースオキシダーゼは元の酸化型に戻る。また、このようなグルコースの酸化反応と同時に過酸化水素が生成される。このとき、電圧印加回路21により、作用極13と対極14との間に所定の電圧が印加されていると、生成した過酸化水素が電解酸化され、これにより作用極13と対極14との間に過酸化水素の酸化電流が流れる。この酸化電流は、電流測定回路22で測定することができる。この酸化電流の大きさは、生成する過酸化水素量に依存している。したがって、過酸化水素の生成量が被検査液中のグルコース濃度に依存していることから、酸化電流の大きさを測定することにより、被検査液中のグルコース濃度を決定することができる。すなわち、このときの電流の時間変化は、被検査液中の基質であるグルコース濃度に依存して既知の関数に乗る。このため、電流変化を検出すれば基質濃度を測定することが可能となる。

【0010】次に、本実施形態のバイオセンサ11を製造するには、まず、連続多孔質基板12の一方の表面に作用極13を、真空蒸着法、マグネツトスパッタリング法、スクリーン印刷法、電解メッキ法、無電解メッキ法等により形成する。また、絶縁性樹脂である基板15の一方の表面に対極14を形成したものを用意し、対極14と連続多孔質基板12の他方の表面を合わせた後、絶縁膜16と絶縁膜17とを周知の技術を用いて被覆する。なお、対極14、基板15および絶縁膜16の開口部18に相当する部分には、予め切欠を形成しておく。なお、上記した製造方法では、作用極13と連続多孔質基板12、および基板15と対極14を接着剤を用いて接着してもよいし、各部材を束ねて最終的にこれらを保持部材により固定する構成としても勿論よい。

【0011】(実施形態2)図2は、本発明の実施形態2を示している。なお、本実施形態を説明するに当たり、上記実施形態1と同一部分には同一の符号を付してその説明を省略する。本実施形態は、同図(B)に示すように、対極14の連続多孔質基板12に対する占有面

50

積を小さくし、作用極13の検出部13Bと開口部18の底面との間の部分を境界として対極14が検出部13Bと対向する側に設けられている。なお、対極14の一側縁部からは、連続多孔質基板12の側縁に沿って、対極14と同一部材でなる、接続用の幅狭部14Aが延在されている。この幅狭部14Aの端部が配線19と接続されるようになっている。また、連続多孔質基板12における対極14が接していない領域には、図2(A)に示すように開口部18を除いて絶縁層23が対極14と同一の厚さで形成されている。

【0012】本実施形態では、開口部18から導入された被検査液が、連続多孔質基板12を介して作用極13の検出部と対極14との間に迅速に導かれる点では、上記実施形態1と同様であるが、対極14と作用極13との対向する面積が、作用極13の検出部13Bの面積に限定されるため、酵素反応に伴う電流測定の電極面積を厳密に決定することができる。このため、精度の高い基質濃度の測定を行うことができる。

【0013】(実施形態3)図3は本発明の実施形態3を示している。この実施形態を説明するに当たり、上記実施形態1および実施形態2と同一部分には同一の符号を付してその説明を省略する。図3(A)は本実施形態のバイオセンサの要部断面図、図3(B)はバイオセンサの平面図、図3(C)は図3(B)のA-A断面図である。本実施形態のバイオセンサは、図3(A)に示すように、作用極13の検出部13Bに対向する部分の対極14と連続多孔質基板12とが間隙24を介して対向するように設けられていることを特徴としている。

【0014】本実施形態では、連続多孔質基板12と対極14との間にスペーサとしての絶縁層23が介在され、作用極13の検出部13Bに対向する対極14と、連続多孔質基板12との間に間隙24が形成されている。この絶縁層23の形状は、図3(B)に示すように、中央から長手方向の一側縁まで切り欠かれた略U字形状であり、対極14、基板15および絶縁層16に形成された開口部18と、作用極13の検出部13Bとは、平面的に見て絶縁層23の切り欠かれた領域内に位置するようになっている。また、基板15、対極14、連続多孔質基板12、作用極13、絶縁層16、17は、可撓性を有する材料で構成され、かつ絶縁層16、17は柔軟性を有する樹脂材料で構成されている。また、図4に示すように、各部材の角部には、丸みが付けられている。このため、本実施形態のバイオセンサを人体、例えばまぶたの下に挿入して検査する場合や、口の中に挿入して検査する場合などに、人体を損傷することなく使用することができる。また、各部材が可撓性を有するため、例えば口の中などで変形させて使用することも可能となる。

【0015】また、本実施形態においては、絶縁層23が介在された対極14と作用極13(幅狭部13A)と

の間には酵素反応に伴う電流が流れにくくなっており、主に作用極13の検出部13Bと対極14との間の過酸化水素の酸化電流を測定することができるため、精度の高い測定を行えるという利点がある。また、連続多孔質基板12と対極14との間の間隙24には、被検査液が毛細管現象により速やかに浸透するため、迅速かつ確実な測定を行うことができる。

【0016】また、連続多孔質基板12及び対極14を洗浄する際、間隙24内に洗浄液が速やかに浸透することができ、開口部18に液が停滞しないので容易に洗浄することができる。以上、各実施形態について説明したが、この発明は、これに限定されるものではなく、構成の要旨に付随する各種の設計変更が可能である。

【0017】上記各実施形態に用いられる多孔質基板12は、例えば親水化処理したテフロン膜(孔径 $0.2\mu\text{m}$) [商品名: オムニポア膜メン] にグルコースオキシターゼと牛血清アルブミンの混合溶液を染み込ませ、グルタルアルデヒドで架橋し、テフロン膜の表面及び内部面にグルコースオキシターゼを固定化したものであってもよいし、これに限らなくてもよい。上記各実施形態においては、連続多孔質基板12に固定化される酵素としてグルコースオキシターゼを用いたが、この酵素にメディエータを共存させて固定化した構成としてもよい。このようにメディエータを共存させれば、基質(グルコース)を酸化させて、それ自身が還元された還元型酵素が元の酸化型に戻る際、メディエータが酵素から電子を奪い、還元型メディエータとなる。そして、この還元型メディエータが電極間に生じる反応によって電子を与え、これにより元の酸化型メディエータに戻る。すなわち、酵素とメディエータを含む多孔質基板中に基質が存在すれば、酵素とメディエータを介して電子が電極に移動し、基質濃度に応じた電流が流れる。したがって、この電流を検出すれば基質濃度を測定することができる。

【0018】このように酵素とメディエータとを多孔質基板中に共存させて固定化すれば、被検査液中に溶解酵素が極少であっても、基質濃度に応じた電流が流れるため、溶解酵素濃度に依存しない検出測定することができる。また、溶液中のpHを一定にするために開口部内に適量の緩衝溶液を浸しておいてもよい。

【0019】上記実施形態では、開口部18に対応する部分に作用極の幅狭部が重なっているが、これに限らず、幅狭部が開口部を迂回して形成されてもよい。また、本実施形態では、基質としてのグルコース濃度を測定するためにグルコースオキシターゼを用いたが、測定対象となる基質に応じて各種の酵素あるいは、酵素とメディエータとを固定化する構成としてもよい。

【0020】また、上記各実施形態においては、基板15を有する構成としたが、これを省略しても勿論よい。さらに、対極14や作用極13の形状は、上記各実施形

態の他に各種の形状とすることが可能であり、要は作用極と対極とが連続多孔質基板を挟んで、または連続多孔質基板と間隙を挟んで設けられ、かつ両電極の対向する位置の近傍に被検査液を導入する開口部を備えている構成であればよい。

【0021】

【発明の効果】以上の説明から明らかなように、この発明によれば、被検査液が微量でも迅速に基質濃度の測定ができるという効果を奏する。また、連続多孔質層内に酵素を固定化しているため、酵素反応を効率的に行わせることができるという効果を有する。さらに、被検査液が微量でも確実に一対の電極間に介在させることができるため、電極間が短くてよく、装置の小型化を図ることができる。また、可撓性や柔軟性を有する材料で各部材を構成することにより、人体に損傷を与えないバイオセンサを実現することができる。

* 【図面の簡単な説明】

【図1】(A)は本発明の実施形態1の断面図、(B)は実施形態1の平面図。

【図2】(A)は本発明の実施形態2の断面図、(B)は実施形態2の平面図。

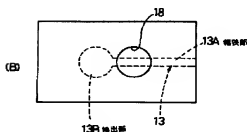
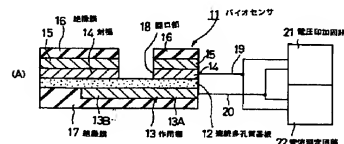
【図3】(A)は本発明の実施形態3の断面図、(B)は実施形態3の平面図、(C)は(B)のA-A断面図。

【図4】従来例の要部断面図。

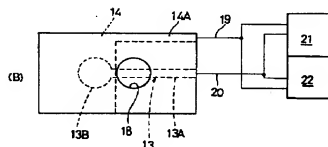
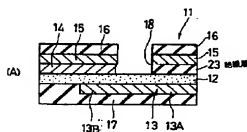
10 【符号の説明】

- 11 バイオセンサ
- 12 連続多孔質基板
- 13 作用極
- 14 対極
- 16、17 絶縁膜
- 18 開口部

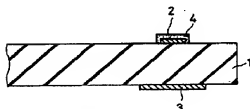
【図1】



【図2】



【図4】



【図3】

